

## OPTIMIZACIJA EKSTRAKCIJE MAKROELEMENATA IZ MATIČNJAKA METODOM ODZIVNE POVRŠINE

Milan Mitić<sup>1</sup>, Aleksandra Pavlović<sup>2</sup>, Pavle Mašković<sup>3</sup>, Jelena Mitić<sup>4</sup>

**Izvod:** Proučavani su efekti solvomodula (15-30 ml g<sup>-1</sup>, zapremina rastvarača po g suvog materijala), temperature (40-100°C) i vremena ekstrakcije (20-80 min) kao i njihovih interakcija na ekstrakciju makroelemenata iz matičnjaka. Optimalni uslovi za ekstrakciju makroelemenata određeni su metodom odzivne površine. Trofaktorijski dizajn na dva nivoa (2<sup>3</sup>) pokazao je dobro slaganje polinomnog regresionog modela sa eksperimentalnim rezultatima, pri čemu su linarni korelacioni koeficijenti iznosili 0,9997, 0,9992, 0,9985 i 0,9989 za K, Ca, Mg i P, respektivno.

**Ključne reči:** makroelementi, ekstrakcija, matičnjak, metoda odzivne površine, regresiona analiza

### Uvod

Biljni čajevi se dobijaju iz različitih lekovitih biljaka i predstavljaju mešavinu napravljenu od svežih ili suvih listova, cveća, korenja ili semena različitih vrsta biljaka. To su napici koji se dobijaju kada se vrelom vodom preliju različite usitnjene biljke. Biljni čajevi su jako zastupljeni u narodnoj medicini kao alternativni lekovi.

Čaj od matičnjaka je poznat dugi niz godina kao veoma efikasan u lečenju poremećaja centralnog nervnog sistema. Matičnjak (*Melissa officinalis*) je višegodišnja biljka iz porodice usnatice (*Lamiaceae*), poreklom iz Južne Evrope i Mediterana. Sastojci čaja matičnjaka su uglavnom flavonoidi i polifenoli, ali se u njemu mogu naći i esencijalni i neesencijalni elementi koji su od suštinskog značaja. Mnogi elementi igraju vitalnu ulogu u metaboličkim procesima, ali neki od njih mogu biti i toksični.

Određivanje sadržaja metala u čajevima je veoma važno da bi se odredilo da li se njihova koncentracija nalazi u okviru propisanih vrednosti, odnosno da li je kvalitet čaja zadovoljavajući, tako da ne utiče negativno na zdravlje ljudi koji ga konzumiraju. Način pripreme čaja ima uticaja na njegovo dejstvo i zato ga treba pripremiti na pravi način.

Cilj ovog rada je bio analiza i poređenje efekata kao što su temperatura, vreme i odnos zapremina vode/masa biljne sirovine (solvomodul, mL/g) na ekstrakciju makroelemenata u vodenim ekstraktima (čajevima) matičnjaka. U tu svrhu korišćena je optička emisija spektrometrija sa induktivno spregnutom plazmom kao izvorom pobuđivanja (ICP-OES), a u cilju optimizacije procesa ekstrakcije primenjena je metoda odzivne površine (*Response Surface Methodology-RMS*).

<sup>1,2</sup>Univerzitet u Nišu, Prirodno matematički fakultet, Višegradska 33, Niš, Srbija (milanmitic83@yahoo.com);

<sup>3</sup>Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku, Cara Dušana 34, Čačak, Srbija

<sup>4</sup>Univerzitet u Nišu, Mašinski fakultet, Aleksandra Medvedeva 14, Niš, Srbija

## Materijal i metode rada

### Ekstrakcija iz biljne sirovine

Tačno odmerena masa, predhodno blenderom homogenizovanog suvog biljnog materijala (oko 2,00 g), prenešena je u erlenmajerovu bocu u koju je dodato 30 ili 60 cm<sup>3</sup> dejonizovane vode. Nakon stajanja 20 ili 80 min na vodenom kupatilu na 40 ili 100°C, rastvor je proceđen kroz kvantitativni filter papir.

### ICP-OES metoda za određivanje makroelemenata

Pri operativnim uslovima eksterimenta (ICP-OES iCAP 6000, Thermo Fisher Scientific Inc, Nemačka)(snaga radiofrekventnog generatora–1150W, brzina pumpe–50rpm, protok gasa za hlađenje–12L/min, protok raspršivačkog gasa–0,7L/min, pravac posmatranja–aksijalni, vreme ispiranja–30s, tri probe za svako merenje) određeni su analitički parametri za ispitivane elemente i u Tabeli 1 prikazane odabrane talasne dužine za svaki element, koeficijent korelacije i granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ).

Tabela 1. Parametri kalibracione prave za određivane elemente  
*Table 1. Parameters of calibration curve for the measured elements*

Metal	$\lambda$ (nm)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	korelacioni koeficijent
Ca	393,366	0,0001	0,0004	0,9901
K	766,490	0,0019	0,0064	0,9998
Mg	279,533	0,0002	0,0007	1
P	177,495	0,0033	0,0108	0,9999

Za određivanje sadržaja makroelemenata u vodenim ekstraktima matičnjaka konstruisane su kalibracione prave korišćenjem tri standarda, od kojih su dva pripremljena razblaženjem referentnog multi standarda (Ultra scientific analitical solutions, USA) koncentracije 2 i 5 ppm, a treći je bila dejonizovana voda.

### Optimizacija procesa ekstrakcije

*Metoda:* trofaktorijski dizajn na dva nivoa (2<sup>3</sup>)

*Promenljivi faktori i nivoi:* prikazani u tabeli 2

*Matrica eksperimenta:* prikazani u tabeli 2

*Odziv:* sadržaj makroelemenata (mg/g suve materije).

Tabela 2. Ispitivani parametri i njihovi nivoi vrednosti

*Table 2. Test parameters and their level values*

Faktor	Promenljiva	Niži nivo	Viši nivo
Solvomodul (V/m)	x <sub>1</sub>	15	30
Temperatura (°C)	x <sub>2</sub>	40	100
Vreme (min)	x <sub>3</sub>	20	80

Tabela 3. Prikaz promenljivih faktora i nivoa u procesu ekstrakcije  
 Table 3. Overview of variable factors and the level of the extraction process

Broj eksperimenta	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Solvomodul (V/m)	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Odziv
1	-1	-1	-1	15	40	20	
2	+1	-1	-1	30	40	20	
3	-1	+1	-1	15	100	20	
4	+1	+1	-1	30	100	20	
5	-1	-1	+1	15	40	80	
6	+1	-1	+1	30	40	80	
7	-1	+1	+1	15	100	80	
8	+1	+1	+1	30	100	80	

### Rezultati istraživanja i diskusija

Metoda odzivne površine (*RSM-response surface methodology*) spada u najčešće korišćene postupke statistički planiranih eksperimenata (Myers i Montgomery, 2002). Ova metoda može se definisati kao empirijska statistička tehnika primenjena za regresionu analizu podataka dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata simultanim rešavanjem sistema jednačina. Svaka od jednačina naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina, koja se može prikazati u tri dimenzije ili kao konturne površine, u dve dimenzije. Odzivne funkcije su polinomskog oblika s obzirom na to što se kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma. Ovakvi modeli su posebno pogodni za rešavanje optimizacionih problema, jer je njima moguće opisati interakcije velikog broja faktora, a procena kvaliteta fitovanja polinomskih modela se može lako odrediti (Radojković, 2012).

U ovom radu primenom faktornog dizajna  $2^3$  ispitan je uticaj tri promenljiva faktora u procesu ekstrakcije i njihove međusobne interakcije na sadržaj makroelemenata, Ca, Mg, K i P u vodenim ekstraktima matičnjaka, koji odgovaraju matrici dizajna eksperimenta. Ispitivani faktori su solvomodul ( $x_1$ ), temperatura ( $x_2$ ) i vreme ( $x_3$ ) ekstrakcije, dok je stepen usitnjenosti materijala bio konstantan ( $<0,6\text{mm}$ ). Rezultati određivanja sadržaja makroelemenata u dobijenim vodenim ekstraktima prikazani su u Tabeli 4.

Da bi se odredila relacija između odziva i ispitivanih faktora (solvomodul, temperatura, vreme) kao i odziva i međufaktora primenjena je linearna regresiona analiza. Puna regresiona jednačina ima oblik:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (1)$$

Izračunate vrednosti regresionih koeficijenata i  $t$ -odnosa dati su u Tabeli 5.

Tabela 4. Sadržaj makroelemenata u ispitivanim ekstraktima matičnjaka ( $\text{mg g}^{-1}$ )

Table 4. Contents of major elements in the extracts of lemon balm ( $\text{mg g}^{-1}$ )

Broj eksp.	K		Ca		Mg		P	
	$q_{\text{eks.}}$	$q_{\text{izr.}}$	$q_{\text{eks.}}$	$q_{\text{izr.}}$	$q_{\text{eks.}}$	$q_{\text{izr.}}$	$q_{\text{eks.}}$	$q_{\text{izr.}}$
1	0,155	0,155	0,045	0,048	0,008	0,007	0,009	0,010
2	0,327	0,327	0,104	0,106	0,020	0,019	0,018	0,018
3	7,959	7,057	1,592	1,592	0,755	0,755	1,562	1,562
4	8,749	8,749	1,562	1,562	0,706	0,707	1,708	1,706
5	0,488	0,489	0,194	0,194	0,037	0,037	0,076	0,076
6	1,044	1,045	0,592	0,592	0,093	0,093	0,143	0,142
7	18,913	18,911	5,429	5,426	1,646	1,645	3,723	3,721
8	9,247	9,247	1,968	1,968	0,873	0,873	1,776	1,776

Tabela 5. Vrednosti regresionih koeficijenata i t-odnosa za makroelemente

Table 5. Values of regression coefficients and t-relation of microelements

Element	$b_0, t$	$b_{1, t}$	$b_{2, t}$	$b_{3, t}$	$b_{12, t}$	$b_{13, t}$	$b_{23, t}$	$b_{123, t}$
K	5,860	-1,018	5,536	1,563	-1,200	-1,259	1,300	-1,355
	120,08	20,87	109,77	32,02	24,60	25,79	26,24	27,76
Ca	1,436	-0,379	1,201	0,609	-0,493	-0,386	0,451	-0,471
	164,46	43,45	137,68	69,86	56,52	44,26	51,64	53,98
Mg	0,517	-0,094	0,478	0,145	-0,111	-0,085	0,119	-0,096
	52,24	9,52	48,26	14,65	11,23	8,58	12,07	9,69
P	1,127	-0,216	1,065	0,303	-0,235	-0,254	0,255	0,269
	164,51	31,47	155,53	44,17	34,16	37,13	37,13	39,25

Dobijeni rezultati ( $b_1$ - $b_{123}$ ) pokazuju da najveći uticaj na sadržaj makroelemenata ( $b_2$ ) ima temperatura zbog veće rastvorljivosti ekstrahovanih supstanci. Uticaj solvomodula je manji ( $b_1$ ) od uticaja vremena ekstrakcije ( $b_3$ ) i ima negativan znak, što znači da povećanje solvomodula u ekstragensu za ekstrakciju dovodi do smanjenja sadržaja makroelemenata. Analizirajući vrednosti regresionih koeficijenata vidi se, takođe, da postoje i uticaji međufaktora koji su od manje važnosti jedino kada se uporede sa uticajem temperature.

Poređenjem izračunatih t-odnosa sa tabličnim  $t_{0,95(3)}=3,18$ , vidi se da su pri ekstrakciji makroelemenata vodom iz matičnjaka bitni svi koeficijenti, pa je za izračunavanje njihovog sadržaja u ekstraktima potrebno koristiti punu regresionu jednačinu (1), nakon zamene odgovarajućih regresionih koeficijenata za svaki element pojedinačno. Izračunate vrednosti su prikazane u tabeli 4.

Pogodnost modela, odnosno da li model odgovara eksperimentalnim uslovima, tumači se na osnovu vrednosti korena srednjeg kvadrata (**Root Mean Square, RMS**, Kitanović i sar., 2008), standardne devijacije (**SD**) (Rahmanian i sar., 2011) i koeficijenta determinacije ( **$R^2$** ), kao mera odsstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata. Visoke vrednosti za  $R^2$  i male vrednosti za **RMS** i **SD** ukazuju na adekvatno fitovanje eksperimentalnih rezultata (Menkiti i sar., 2015).

Tabela 6. Poređenje prosečnih vrednosti za RMS, SD i  $R^2$  za različite makroelemente  
Table 6. Comparison of the average values of RMS, SD and  $R^2$  for different macroelements

Metal	% RMS	%SD	% $R^2$
K	0,81	0,74	99,97
Ca	2,45	2,13	99,92
Mg	4,76	4,19	99,85
P	3,94	3,74	99,89

Vrednost koeficijenta determinacije 0,9997, dobijen za fitovanje rezultata dobijenih pri određivanju sadržaja kalijuma u vodenim ekstraktima matičnjaka, ukazuje da 0,3% varijacije nije moglo biti objašnjeno ovim modelom, dok u slučaju magnezijuma on iznosi 0,8%. S obzirom na mali broj eksperimentalnih podataka korišćenih u ovom radu, kao i podataka prikazanih u Tabeli 6, može se prihvatiti da je regresiona funkcija predstavljna jednačinom (1) potpuno zadovoljavajuća.

### Zaključak

Na povećanje sadržaja mineralnih makroelemenata utiču: temperatura ekstrakcije, vreme ekstrakcije i solvomodul. Veća koncentracija makroelemenata se postiže: pri višim temperaturama, zbog veće rastvorljivosti ekstraktivnih supstanci, sa dužim ekstrahovanjem i pri manjem solvomodulu (15), zbog manjeg razblaženja. Metoda odzivne površine je uspešno primenjena na proces ekstrakcije makroelemenata iz matičnjaka.

### Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta ON 174007 - "[Funkcionalna analiza, stohastička analiza i primene](#)" koji finansira [ministarstvo prosvete, nauke](#) i tehnološkog razvoja.

### Literatura

- Myers R.H., Montgomery C.M. (1995). Response surfaces methodology: process and product optimization using designed experiments, Wiley, New York.
- Radojković M. (2012). Ekstrakti duda (*Morus* spp., *Moraceae*), sastav, delovanje i primena, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Kitanović S., Milenović D., Veljković V.B. (2008). Empirical kinetic models for the resinoid extraction from aerial parts of St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). Biochem. Eng. 41, 1-11
- Rahmanian B., Pakizeh M., Mansoori S.A.A., Abedini R. (2011). Application of experimental design approach and artificial neural network (ANN) for the determination of potential micellar-enhanced ultrafiltration process. J. Hazard. Mater. 187, 67-74
- Menkiti M., Agu C.M., Udeigwe T. (2015). Extraction of oil from *Terminalia catappa* L.: Process parameter impacts, kinetics, and thermodynamics, Ind. Crops Prod. 77, 723-723.

## OPTIMIZATION OF MACROELEMENTS EXTRACTION FROM LEMON BALM USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

*Milan Mitić<sup>1</sup>, Aleksandra Pavlović<sup>2</sup>, Pavle Mašković<sup>3</sup>, Jelena Mitić<sup>4</sup>*

### Abstract

The effects of liquid-solid ratio (15-30 ml g<sup>-1</sup>, solvent volume per g of dry material), temperature (40-100°C) and time extraction (20-80 min) such as their interaction on extractability of macroelements of lemon balm were studied. The optimal conditions for the macroelements extraction were determined by response surface methodology. The 2<sup>3</sup> design showed that polynomial regression models were in good agreement with the experimental results with the linear correlation coefficients of 0.9997, 0.9992, 0.9985 and 0.9989 for K, Ca, Mg and P, respectively.

**Key words:** macroelements, extraction, lemon balm, response surface methodology, regression analysis

---

<sup>1,2</sup>University of Niš, Faculty of Science and Mathematics, Višegradska 33, Niš, Serbia (milanmitic83@yahoo.com);

<sup>3</sup> University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Čačak, Cara Dušana 34, Čačak, Serbia

<sup>4</sup> University of Niš, Faculty of Mechanical Engineering, Aleksandra Medvedeva 14, Niš, Serbia